SHIMADZU BIOTECH
bringing analysis to life

C297-0327A

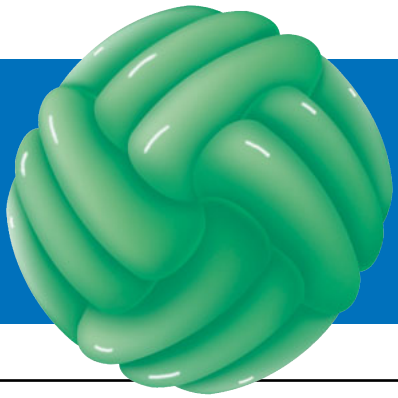
無細胞タンパク質合成試薬キット
Transdirect *insect cell*

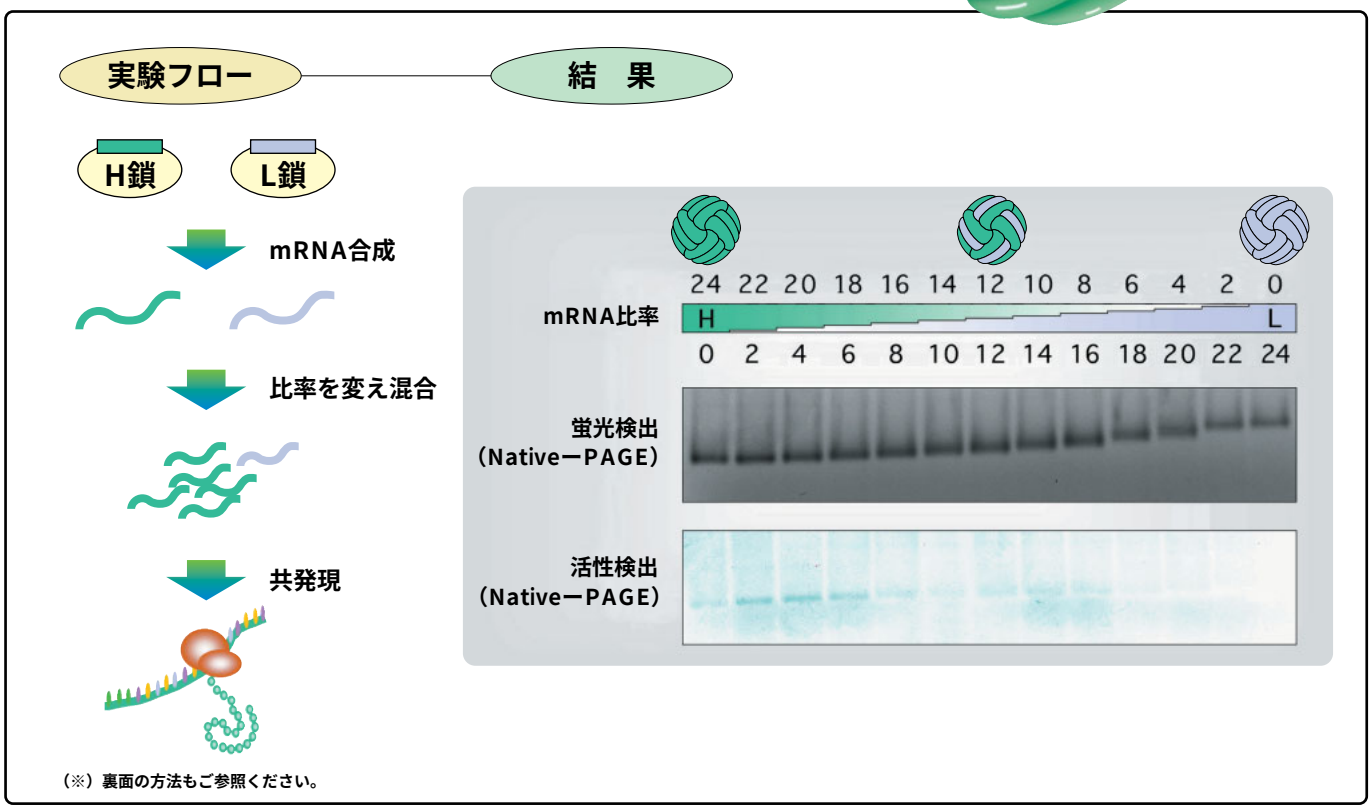
アプリケーションデータ 1

［発現量コントロールによる複合多量体タンパク質の合成］

フェリチンは、細菌から哺乳類まで幅広く存在する鉄貯蔵タンパク質です。24量体を形成し空洞となった構造体内に鉄イオンを貯蔵する能力を持ち、取込み時に2価イオンを3価イオンに酸化することで、生体内で有害となる2価イオンの無毒化にも寄与しています。
ヒトのフェリチンは、H鎖とL鎖のサブユニットが存在します。フェリチンは各臓器に存在しますが、それぞれのフェリチンは H鎖と L鎖の組成が異なっており、これらの組成比によって貯蔵能と酸化能が異なることが報告されています。

任意の組成比を持つフェリチンの合成を目的に、H鎖とL鎖をそれぞれコードするmRNAを合成し、形成したい組成比になるようmRNAの量を調節して、Transdirect *insect cell*を用いて共発現を行いました。





（※）裏面の方法もご参照ください。

Native-PAGEの結果より、H鎖、L鎖mRNAの比率に応じ段階的な電荷を持つフェリチンが合成されていることが認められました。また、活性染色によって、構造体内に貯蔵された鉄イオンを染色することにより、(H，L）=（22，2)～(18，6）の間で強い活性を持つことが確認されました。これは既報の生体内での結果と一致するものでした。

以上より、それぞれのサブユニットをコードするmRNA量をタンパク質合成時に変化させることで、異なる組成を持つタンパク質を自由に合成できる一例を示すことが出来ました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方 法

・発現ベクターpTD1へのクローニング

ヒトフェリチンH鎖、L鎖のORFをキット付属の取扱説明書に従い、pTD1にクローニングした。

・mRNA合成・精製

キット付属の取扱説明書に従って行った後、2mg/mLに調製したヒトフェリチンH鎖、及びL鎖をそれぞれコードするmRNAを、H：L ＝ 24：0、22：2、20：4、・・・・、2：22、0：24の混合比率で混合し、16ug（8uL）のmRNA混合液を調製した。

・タンパク質合成

キット付属の取扱説明書に従い、蛍光標識されたリジン*を取り込ませて行った。

*FluoroTect GreenLys in vitro Translation Labeling System（Promega，L5900）

・合成タンパク質の検出、及び活性検出

6%アクリルアミドゲルを用いたNaitve-PAGE法により分離した後、蛍光イメージアナライザーを用いて検出した。その後、活性染色により、Prussian Blue Stain法（1% フェロシアン化カリウム、1% 塩酸水溶液中で30分）によって検出した。

詳細なプロトコルがご必要な場合は、下記までお問合せください。

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL （075）823-1351
WEB https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

■キット内容 ・Insect Cell Extract（黄）×5本 ・Reaction Buffer（青）×1本
・4mM Methionine（赤）×1本 ・0.5μg/μL Control DNA（白）×1本
・0.5μg/μL pTD1 Vector（緑）×1本 ・取扱説明書

■反応回数：40回（50μL合成反応系）
■保存温度：−80℃
■価 格：31,185円（税込）

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合せください。） ■価格（税込）

20キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット20 (P/N 292-30000-92)	404,250円
50キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット50 (P/N 292-30000-93)	924,000円
100キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット100 (P/N 292-30000-94)	1,617,000円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

※価格は2008年10月1日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため，予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

JQA-0376

島津製作所 分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1（075）823-1351
http://www.shimadzu-biotech.jp/

取次店

3219-11802-500-AD